

CE

RealCycler®

Progenie molecular
Artes y Oficios 37. Valencia 46021. España. Tel. 902 91 05 05 Fax 902 91 05 06
www.progenie-molecular.com

GRHI v.3

1 Uso previsto

RealCycler GRHI es un kit de reactivos que permite la detección cualitativa por PCR a tiempo real del ARN de Influenza A, B y del gen H1 de la nueva variante de gripe (H1N1) en muestras clínicas, utilizando un equipo *SmartCycler*® (*Cepheid*®). El sistema incluye un control interno de amplificación para prevenir los falsos negativos debidos a la inhibición de la reacción.

2 Especificaciones

- Sensibilidad: 100 copias/µL Influenza A, 100 copias/µL Influenza B y 500 copias/µL Influenza A H1N1.
- Especificidad: Influenza A (gen M1 y M2 (matrix protein)), Influenza B (gen M1 y M2 (matrix protein)) e Influenza A H1N1 (gen hemaglutinina).

3 Estabilidad y almacenamiento

Todos los componentes del kit *RealCycler* GRHI deben ser almacenados a -20ºC.
El kit es estable a - 20ºC hasta la fecha de caducidad (ver etiqueta externa del kit).

4 Descripción del método

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) está basada en la amplificación de una región específica del genoma del patógeno usando primers y sondas específicos. En la PCR a tiempo real se utilizan sondas marcadas con fluorocromos. Hay una emisión de fluorescencia que es proporcional a la cantidad de ADN/ARN presente en la muestra. El *Cycle threshold* (Ct) es el ciclo de la PCR en el que se detecta inicialmente un aumento en la señal de fluorescencia. En la amplificación GRIP , Influenza A se detecta en FAM, Influenza B se detecta en TxR y el control interno en Alx532. En la amplificación de H1N1, H1N1 se detecta en FAM y el control interno en Alx532.

5 Composición

RealCycler GRHI incluye las mezclas de reacción **Amplimix GRIP** y **Amplimix HINI** dispensadas en tubos de amplificación, una **retrotranscriptasa**, un **Control Positivo ARN FluA** y un **Control Positivo ARN FluA H1N1.** Todos los reactivos están listos para su uso sin añadir ni reconstituir ningún componente.

Componente	Viales	Número	Volumen	Conservación
AmpliMix GRIP		12	22,8 µL	-15 /-25 ºC
AmpliMix HINI		12	22,02 µL	-15 /-25 ºC
Control Positivo ARN FluA		1	60 µL	-15 /-25ºC
Control Positivo ARN FluA H1N1		1	60 µL	-15 /-25ºC

Componente	Viales	Número	Volumen	Conservación
Retrotrans-criptasa		1	8,5 µL	-15/-25 ºC

6 Material y equipamiento adicional requerido y no suministrado

- Equipo de PCR a tiempo real *SmartCycler*® (*Cepheid*®)
- Microcentrífuga para tubos *SmartCycler*®
- Gradillas para tubos *SmartCycler*®
- Kit de extracción de ADN/ARN
- Guantes desechables
- Pipetas calibradas
- Puntas de pipeta con filtro
- Congelador (-20ºC)

7 Advertencias y precauciones

- Todos los componentes del kit deben mantenerse en frío mientras se están manipulando.
- Después de añadir el ADN/ARN, minimizar el tiempo necesario para iniciar el programa de amplificación.
- Los tubos con la mezcla de amplificación no deben exponerse a la luz durante un periodo de tiempo prolongado.
- Descongelar y congelar repetidas veces los reactivos puede disminuir la sensibilidad del kit.
- Usar guantes desechables.
- Usar pipetas calibradas y puntas de pipeta con filtro.
- Los ensayos deben llevarse a cabo por personal cualificado y siguiendo las buenas prácticas de laboratorio.
- No usar el kit después de la fecha de caducidad.
- Uso para diagnóstico *in vitro*.
- *Cepheid* y *SmartCycler* son marcas registradas de Cepheid Corporation.

8 Muestras clínicas

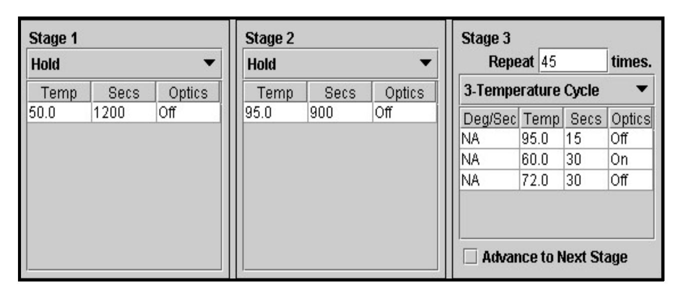
- Recoger las muestras en tubos estériles.
- Almacenarlas y transportarlas congeladas a -20ºC hasta su uso.
- Utilizar ADN/ARN bien purificado y libre de inhibidores de la PCR.

9 Procedimiento

a) Extracción de ARN

Procedimiento GRIP (tubo blanco)

b) Protocolo



c) Preparación de la reacción

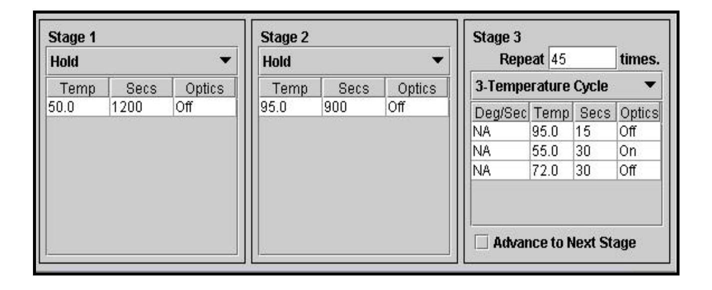
- Descongelar los tubos **AmpliMix GRIP** necesarios para amplificar las muestras y el **Control Positivo ARN FluA**.
- Añadir **0,3 µL** de **Retrotranscriptasa** (tapón azul).
- Añadir **7,5 µL** del ARN de cada muestra o control a cada tubo.
- Centrifugar los tubos para que la reacción pase a la zona óptica del tubo. Verificar que no se forman burbujas en la zona óptica.
- Colocar los tubos en el equipo.
- *Create Run* > *Dye Set* > FATA25
- *Add/Remove Sites:* asignar el protocolo "GRIP" a las posiciones correspondientes a las muestras y los controles.
- *Start Run:* iniciar el programa de amplificación.

d) Interpretación de los resultados

FAM Std/Res	TxR Std/Res	Alx532 Std/Res	Alx532 Ct	Interpretación
POS	ND	Indiferente	Indiferente	POSITIVO Influenza A
ND	POS	Indiferente	Indiferente	POSITIVO Influenza B
POS	POS	Indiferente	Indiferente	POSITIVO Influenza A y B
ND	ND	POS	Ct dentro de rango	NO SE DETECTA
ND	ND	POS	Ct fuera de rango	NO VALORABLE
ND	ND	ND	0,00	NO VALORABLE

Procedimiento HINI (tubo rojo)

b) Protocolo



c) Preparación de la reacción

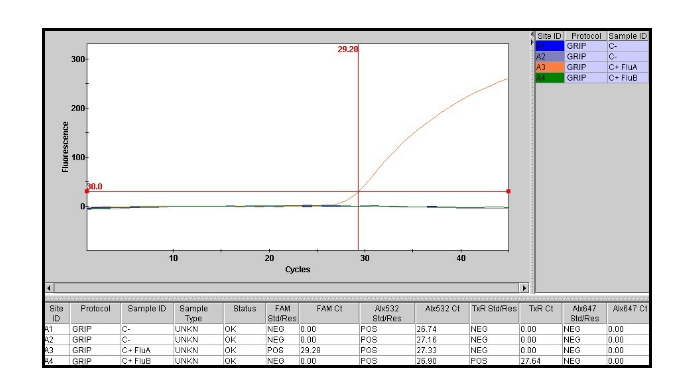
- Descongelar los tubos **AmpliMix HINI** necesarios para amplificar las muestras y el **Control Positivo ARN FluA H1N1**.
- Añadir **0,3 µL** de **Retrotranscriptasa** (tapón azul).
- Añadir **10 µL** del ARN de cada muestra o control a cada tubo.
- Centrifugar los tubos para que la reacción pase a la zona óptica del tubo. Verificar que no se forman burbujas en la zona óptica.
- Colocar los tubos en el equipo.
- *Create Run* > *Dye Set* > FATA25
- *Add/Remove Sites:* asignar el protocolo "HINI" a las posiciones correspondientes a las muestras y los controles.
- *Start Run:* iniciar el programa de amplificación.

d) Interpretación de los resultados

FAM Std/Res	Alx532 Std/Res	Alx532 Ct	Interpretación
POS	Indiferente	Indiferente	POSITIVO FluA H1N1
ND	POS	Ct dentro de rango	NO SE DETECTA
ND	POS	Ct fuera de rango	NO VALORABLE
ND	ND	0,00	NO VALORABLE

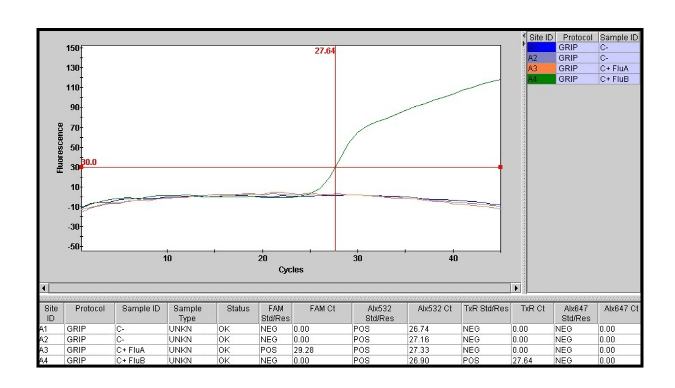
e) Ejemplo de resultado

GRIP:



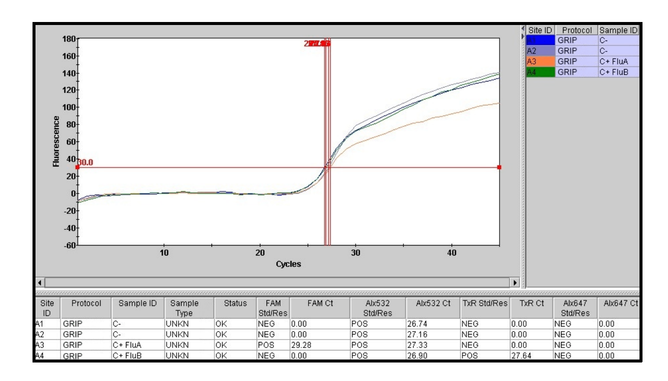
Site ID	Protocol	Sample ID	Sample Type	Status	FAM Std/Res	FAM Ct	Alx532 Std/Res	Alx532 Ct	TxR Std/Res	TxR Ct	Alx647 Std/Res	Alx647 Ct
A1	GRIP	C-	UNKN	OK	NEG	0.00	POS	26.74	NEG	0.00	NEG	0.00
A2	GRIP	C-	UNKN	OK	NEG	0.00	POS	27.16	NEG	0.00	NEG	0.00
A3	GRIP	C+ FluA	UNKN	OK	POS	29.28	POS	27.33	NEG	0.00	NEG	0.00
A4	GRIP	C+ FluB	UNKN	OK	NEG	0.00	POS	26.90	POS	27.64	NEG	0.00

Gráfica 1 (Canal FAM: FluA): Resultado obtenido al amplificar dos controles negativos, un control positivo FluA y un control positivo FluB. Control negativo (A1 en azul): ausencia de señal. Control negativo (A2 en gris): ausencia de señal. Control positivo FluA (A3 en naranja): se observa señal con Ct=29,28. Control positivo FluB (A4 en verde):ausencia de señal.



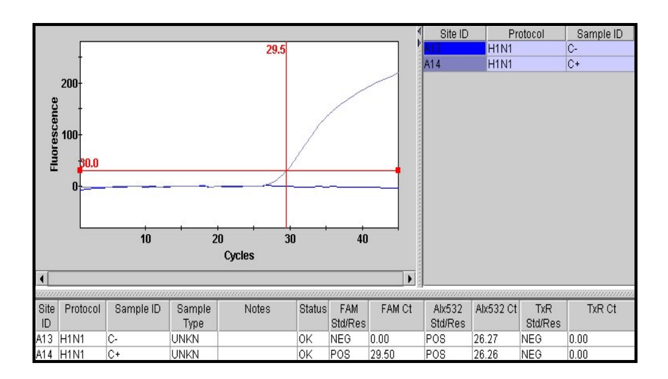
Site ID	Protocol	Sample ID	Sample Type	Status	FAM Std/Res	FAM Ct	Alx532 Std/Res	Alx532 Ct	TxR Std/Res	TxR Ct	Alx647 Std/Res	Alx647 Ct
A1	GRIP	C-	UNKN	OK	NEG	0.00	POS	26.74	NEG	0.00	NEG	0.00
A2	GRIP	C-	UNKN	OK	NEG	0.00	POS	27.16	NEG	0.00	NEG	0.00
A3	GRIP	C+ FluA	UNKN	OK	POS	29.28	POS	27.33	NEG	0.00	NEG	0.00
A4	GRIP	C+ FluB	UNKN	OK	NEG	0.00	POS	26.90	POS	27.64	NEG	0.00

Gráfica 2 (Canal TxR: FluB): Resultado obtenido al amplificar dos controles negativos, un control positivo FluA y un control positivo FluB. Control negativo (A1 en azul): ausencia de señal. Control negativo (A2 en gris): ausencia de señal. Control positivo FluA (A3 en naranja): ausencia de señal. Control positivo FluB (A4 en verde): se observa señal con Ct=27,64.

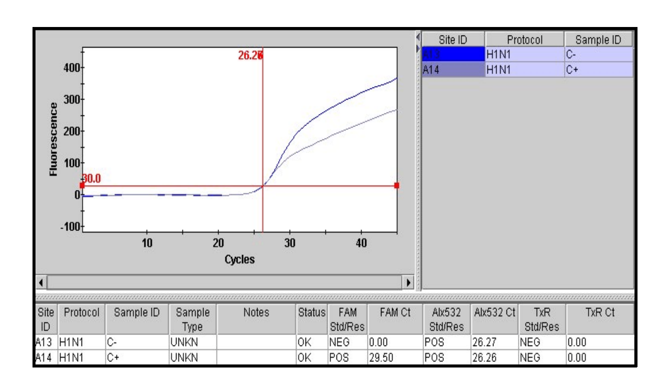


Gráfica 3 (Canal Alx532: control interno): Resultado obtenido al amplificar dos controles negativos, un control positivo FluA y un control positivo FluB. Control negativo (A1 en azul): se observa señal con Ct=26,74. Control negativo (A2 en gris): se observa señal con Ct=27,16. Control positivo FluA (A3 en naranja): se observa señal con Ct=27,33. Control positivo FluB (A4 en verde): se observa señal con Ct=26,90.

HINI:



Gráfica 1 (Canal FAM: FluA H1N1): Resultado obtenido al amplificar un control negativo y un control positivo FluA H1N1. Control negativo (A13 en azul): ausencia de señal. Control positivo FluA H1N1 (A14 en gris): se observa señal con Ct=29,50.



Gráfica 2 (Canal Alx532: control interno): Resultado obtenido al amplificar un control negativo y un control positivo FluA H1N1. Control negativo (A13 en azul): se observa señal con Ct=26,27. Control positivo FluA H1N1 (A14 en gris): se observa señal con Ct=26,26.

10 Control de calidad

Se recomienda que se lleven a cabo controles positivos y negativos cada vez que se realice un análisis.
Para validar los resultados, los valores de Ct obtenidos en los controles positivos y en los controles internos deben encontrarse dentro de los rangos especificados en la etiqueta interna del kit.
Cada lote del kit *RealCycler* GRHI ha sido testado según las especificaciones de la PCR a tiempo real utilizando el equipo *SmartCycler®* (*Cepheid®*).

Fecha de publicación: Marzo 2012.